

## Conservación de semen de borrego a 5 °C utilizando medio suplementado con 0.5, 1.0 y 5.0 mM de glutatión reducido

Alfredo Trejo Cordova<sup>1</sup>, Ismael Abad Benítez, Víctor Manuel Meza Villalvazo,  
Carolina Antonia Estrada, Abel Villa Mancera

Universidad del Papaloapan, campus Loma Bonita, Oaxaca. México.

### Conservation of ram semen at 5 °C using medium supplemented with 0.5, 1.0 and 5.0 mM of reduced glutathione

**ABSTRACT.** The experiment was carried out to determine the most recommendable concentration of reduced glutathione (GSH) to be used during refrigeration of ram semen at 5 °C. Each of a total of 12 ejaculates from two Pelibuey rams was divided into four aliquots corresponding to the GSH concentrations evaluated (0.0, 0.5, 1.0 and 5 mM), which were stored under refrigeration (5 °C) for 24 h. Evaluation of motility and viability was performed at 0, 1, 2 and 24 h of storage. At 24 h, sperm motility was also evaluated at 37 °C (reactivation). At 0, 1 and 2 h of storage there were no significant differences in sperm motility among the different concentrations of GSH. At 24 h, the concentration of 5 mM resulted in the highest ( $p < 0.05$ ) sperm motility (29.22%) and the highest ( $p < 0.05$ ) percentage of mobility during the reactivation (80.29%). As for viability, at 24 h of storage the samples diluted with 5 mM GSH had 81.44% live spermatozoa. It is concluded that the activity of GSH as antioxidant and protector during storage at 5 °C is dependent on concentration and storage time.

**Keywords:** Antioxidant, Conservation, Ram, Reduced glutathione, Refrigerated, Semen

**RESUMEN.** Se realizó un experimento con el objeto de determinar la concentración más recomendable de glutatión reducido (por sus siglas en inglés: GSH) a ser utilizada durante la refrigeración a 5°C del semen de ovino. Se utilizaron un total de 12 eyaculados, procedentes de dos sementales de la raza Pelibuey. Cada eyaculado fue dividido en cuatro alícuotas correspondientes a las concentraciones de GSH evaluadas (0.0, 0.5, 1.0 y 5 mM), las cuales se almacenaron en refrigeración (5°C) durante 24 h. La evaluación de la motilidad y viabilidad se realizó a las 0, 1, 2 y 24 h de almacenamiento. A las 24 h también se evaluó la motilidad espermática a 37 °C (reactivación). A las 0, 1 y 2 h de almacenamiento no hubo diferencias significativas entre motilidades espermáticas cuando se utilizaron las diferentes concentraciones de GSH. A las 24 h, la concentración de 5mM resultó en mayor ( $p < 0.05$ ) motilidad espermática (29.22 %) y mayor ( $p < 0.05$ ) porcentaje de movilidad durante la reactivación (80.29%). Referente a la viabilidad, a las 24 h de almacenamiento las muestras diluidas adicionando 5mM de GSH tuvieron 81.44 % de espermatozoides vivos. Se concluye que la actividad del GSH como antioxidante y como protector durante la conservación a 5 °C es dependiente de la concentración y del tiempo de almacenamiento.

**Palabras clave:** Antioxidante, Conservación, Glutatión reducido, Ovino, Semen refrigerado

### Introducción

La metodología más utilizada cuando se desea conservar semen en forma líquida por periodos no mayores de 24 h es mediante la refrigeración a 5°C, proceso con el cual se obtiene una reducción en la

motilidad y actividad metabólica. Esta reducción en la motilidad puede restablecerse a niveles casi normales cuando los daños producidos por el choque térmico sean mínimos (Vivanco, 1998).

Recibido: 2013-08-02. Aceptado: 2017-01-09.

<sup>1</sup> Autor para la correspondencia: Alfredo Trejo [altrecordova@yahoo.com.mx](mailto:altrecordova@yahoo.com.mx)

Cuando el semen es conservado a temperaturas cercanas a los 0°C, se debe de tener en cuenta que los espermatozoides se someten a un choque térmico, lo cual puede causarles cambios irreversibles (Salomon y Maxwell, 2000), como son deshidratación, distorsión de la membrana, formación de cristales intracelulares y estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es causado por un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (por sus siglas en inglés: ROS - "Reactive Oxygen Species") (Fraczek y Kurpisz, 2005). Sin embargo, los espermatozoides están equipados con sistemas antioxidantes para contrarrestar los efectos tóxicos de las ROS (Hicks *et al.*, 2006). Membrillo *et al.* (2003) indicaron que el glutatión reducido (por sus siglas en inglés GSH) (glutatión que presenta un grupo tiol-SH

del residuo de cisteína) es un agente antioxidante que está presente en el ambiente que rodea al espermatozoide. Los estudios sobre el uso de GSH como antioxidante han establecido varias concentraciones como efectivas. Por ejemplo en el ciervo rojo se ha establecido que el GSH en concentraciones de 1mM y 5mM mejora la velocidad y linealidad espermáticas post-descongelación (Anel-López *et al.*, 2012). Gadea *et al.* (2011) obtuvieron resultados similares para la criopreservación de semen humano. Por su parte, Munsí *et al.* (2007) señalaron que una concentración de 0.5 mM mejora la motilidad espermática cuando los eyaculados de toro son almacenados a 5°C. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la concentración óptima a ser utilizada durante la refrigeración a 5°C del semen de ovino.

## Materiales y Métodos

### Animales

Se utilizaron dos sementales de la raza Pelibuey con una edad aproximada de 2.5 años y una condición corporal aproximada de 3.5 (escala del 1 a 5), alimentados por las mañanas (08:00 a 11:00 h) con pastos nativos de la región {mulato II (*Brachiaria* híbrido, CIAT 36087), insurgente (*Brachiaria brizantha*) y llanero (*Brachiaria dictyoneura*)}; y agua disponible a libre acceso.

**Obtención de eyaculados.** Se obtuvieron un total de 12 eyaculados (dos por semana) utilizando vagina artificial en presencia de una hembra en celo. Una vez obtenidos los eyaculados se trasladaron inmediatamente al laboratorio para ser evaluados y procesados. Se procesaron únicamente aquellas muestras con un volumen mayor a 0.8 mL, una motilidad en masa igual o mayor a 4 (escala: 0 - sin movimiento a 5 - movimiento vigoroso), una concentración mayor de  $2,500 \times 10^6$  por mL y un porcentaje de espermatozoides vivos mayor del 90 (Naim *et al.*, 2009).

**Preparación de diluyente.** Se prepararon 50 mL de la solución base del diluyente de la siguiente composición: leche descremada (6.0 g), glicerol (100 µL) y citrato de sodio (0.43 g). Esta solución, que se mantuvo en refrigeración a 5°C por un tiempo no mayor de dos días, se mezcló en una proporción 1:1 con agua de coco para formar el diluyente.

**Tratamientos.** En cuatro tubos cónicos se colocaron 4 mL del diluyente (2 mL de solución base y 2 mL de agua de coco) y se suplementaron con las siguientes concentraciones de GSH: 0, (control), 0.5 1.0 y 5.0 mM.

**Dilución.** Cada eyaculado fue dividido en cuatro alícuotas y cada alícuota diluida hasta alcanzar la concentración final  $400 \times 10^6$  espermatozoides por mL,

utilizando cada uno de los diluyentes suplementados con GSH. Para realizar el enfriamiento de los eyaculados se siguió la técnica propuesta por Naim *et al.* (2009), disminuyendo la temperatura de las muestras con agua fría. El tiempo total del enfriamiento (de 37° hasta 5 °C) fue aproximadamente 1.5 h. Una vez alcanzada esta temperatura las muestras fueron almacenadas a la misma. Se evaluaron la motilidad progresiva y el porcentaje de espermatozoides vivos a los cuatro siguientes periodos: 0 (recién diluido), 1, 2 y 24 h de refrigeración. A las 24 h también se realizó la evaluación de la motilidad progresiva a una temperatura de 37 °C (reactivación de la motilidad). Para ello 5 µL de muestra fueron diluidos en 100 µL de TCM-199 (2.2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, sin glutamina y 20 mM HEPES; SIGMA, M0939).

**Motilidad en masa.** Se colocó una gota de semen en un portaobjetos atemperado a 37°C y se observó a 40X, evaluando la presencia de ondas. La escala usada fue de 1 a 5, evaluando como 1 al semen que no presenta ondas y 5 cuando las ondas se mueven rápidamente formando remolinos.

**Motilidad progresiva.** Se colocaron 5 µL de semen diluido en un portaobjeto y se observó la motilidad en un microscopio óptico a 40X, calculando el porcentaje de espermatozoides con movimiento.

**Espermatozoides vivos.** Para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos se colocó una gota (aproximadamente 10 µL) de semen en un portaobjetos, y se agregó 5 µL de una solución de eosina-nigrosina al 5%. Después de hacer una homogenización se realizó un frotis, y el conteo de 100 espermatozoides bajo el microscopio (40X).

**Reactivación de la motilidad.** A 5 µL de semen se le adicionó 100 µL de medio TCM-199 (a 37 °C), se

colocó en un portaobjeto 25  $\mu$ L de la dilución anterior, se observó la motilidad en un microscopio óptico a 40X y se calculó el porcentaje de espermatozoides con movimiento hacia delante.

**Análisis estadístico.** Se sometieron los datos a análisis de varianza (ANOVA) con el programa

estadístico SAS (SAS, 1996) para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de GSH sobre los porcentajes de motilidad y viabilidad espermática. La prueba de Tukey fue utilizada para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

## Resultados y Discusión

Mantener los espermatozoides a 5°C durante 24 h redujo la motilidad espermática en todos los tratamientos (Tabla 1). La disminución de la motilidad espermática a temperaturas de 4 - 5°C ha sido relacionada con el choque térmico (Appel *et al.*, 1977). Se considera que el principal sitio de daño asociado a los cambios de temperatura son las membranas espermáticas (Watson, 1995). Cuando la membrana plasmática es afectada por el frío puede sufrir modificaciones en su permeabilidad, que resultan en alteraciones de las funciones metabólicas, perjudicando la motilidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides (Vetter *et al.*, 1998).

Sin embargo, en GSH 5 mM la motilidad fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) luego de 24 h a 5°C en comparación con los otros grupos y 1.0 mM superó a 0 y 0.5 mM. El mecanismo por el cual disminuye la motilidad no ha sido elucidado por completo; sin embargo, se sabe que la motilidad espermática es dependiente de la función mitocondrial (Kao *et al.*, 1998). Las mitocondrias se encuentran estratégicamente distribuidas alrededor de la pieza media del espermatozoide para proveer energía al movimiento que propulsa a los microtúbulos. Las mitocondrias son la mayor fuente de energía oxidativa a través de la producción de ATP vía la cadena transportadora de electrones.

Por otra parte, cuando se realiza la conservación de semen a través de la refrigeración (5°C) uno de los eventos que ocurren es un incremento en la producción de ROS. El estrés oxidativo causado por

el exceso de éstas está relacionado con una disminución de la motilidad y viabilidad espermática (El-Sisy *et al.*, 2007).

Hay varios mecanismos propuestos para explicar el descenso en la motilidad espermática asociado a un estrés oxidativo. La peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados o PUFAs (por sus siglas en inglés Poly-Unsaturated Fatty Acids) en la membrana lipídica es uno de estos mecanismos (Mandal *et al.* 2014). Los espermatozoides son particularmente susceptibles a la lipo-peroxidación debido a la alta concentración de PUFAs en su membrana plasmática. Una consecuencia de la lipo-peroxidación es la pérdida de la fluidez en la membrana plasmática (Aitken *et al.*, 1997). La pérdida de la integridad (fluidez membranar) también ayuda a incrementar la permeabilidad de la membrana y a una pérdida de la capacidad para regular las concentraciones intracelulares de iones involucrados en el control del movimiento espermático.

Después de la reactivación, las muestras que fueron conservadas por 24 h con concentraciones de 5 mM de GSH mostraron mejor motilidad espermática en comparación con las concentraciones de 1.0, 0.5 y 0.0 mM (control), y de 1.0 mM en comparación con 0.5 y 0.0 mM, lo cual indica que el efecto del GSH sobre la motilidad espermática depende de la concentración utilizada.

En cuanto al porcentaje de los espermatozoides vivos (Tabla 2), durante las primeras 2 h de almacenamiento se observó una disminución no

Tabla 1. Porcentaje de motilidad espermática ( $\pm$  DE) durante la refrigeración a 5°C bajo diferentes concentraciones de GSH y luego a la reactivación a 37 °C.

Concentración de GSH (mM)	Tiempo de refrigeración (h)				
	0	1	2	24	Reactivación
0.0	91.61 $\pm$ 5.48 <sup>a</sup>	82.22 $\pm$ 4.08 <sup>a</sup>	81.11 $\pm$ 5.16 <sup>a</sup>	16.44 $\pm$ 2.74 <sup>c</sup>	52.43 $\pm$ 3.51 <sup>c</sup>
0.5	90.56 $\pm$ 4.18 <sup>a</sup>	82.22 $\pm$ 6.32 <sup>a</sup>	77.22 $\pm$ 9.28 <sup>a</sup>	12.00 $\pm$ 2.79 <sup>c</sup>	43.71 $\pm$ 2.65 <sup>c</sup>
1.0	91.67 $\pm$ 4.08 <sup>a</sup>	86.33 $\pm$ 3.01 <sup>a</sup>	84.44 $\pm$ 2.00 <sup>a</sup>	21.44 $\pm$ 2.04 <sup>b</sup>	74.29 $\pm$ 4.01 <sup>b</sup>
5.0	92.78 $\pm$ 4.32 <sup>a</sup>	88.00 $\pm$ 4.02 <sup>a</sup>	83.89 $\pm$ 4.46 <sup>a</sup>	29.22 $\pm$ 2.04 <sup>a</sup>	80.29 $\pm$ 6.10 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup>Literal diferente en una columna indica diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )

significativa entre las diferentes concentraciones de GSH evaluadas. A las 24 h las muestras diluidas con 5 mM de GSH mayor ( $p < 0.05$ ) porcentaje de espermatozoides vivos y 1.0 mM superó a las otras concentraciones de GSH.

En el presente estudio, el porcentaje de espermatozoides vivos mejora de manera significativa cuando se adicionaron 1.0 y 5.0 mM de GSH al diluyente, en comparación con el tratamiento

control. Este efecto del GSH en la viabilidad espermática durante el almacenamiento en refrigeración ha sido observado en ovinos (Bucak y Tekin, 2007), y bovinos (Munsi *et al.*, 2007). El mecanismo a través del cual el GSH mantiene a los espermatozoides viables durante la refrigeración implica la eliminación de los ROS responsables de la lipoperoxidación a nivel de la membrana espermática (Gadea *et al.*, 2004).

Tabla 2. Evaluación del porcentaje de espermatozoides vivos ( $\pm$ DE) durante la refrigeración a 5°C bajo diferentes concentraciones de GSH y luego de la reactivación a 37°C

Concentración de GSH (mM)	Tiempo de refrigeración (h)			
	0	1	2	24
0.0	88.11 $\pm$ 5.67 <sup>a</sup>	77.22 $\pm$ 4.92 <sup>a</sup>	73.33 $\pm$ 8.80 <sup>a</sup>	66.56 $\pm$ 7.07 <sup>c</sup>
0.5	88.56 $\pm$ 3.43 <sup>a</sup>	77.22 $\pm$ 8.15 <sup>a</sup>	77.22 $\pm$ 4.92 <sup>a</sup>	67.78 $\pm$ 8.46 <sup>c</sup>
1.0	91.56 $\pm$ 6.01 <sup>a</sup>	79.67 $\pm$ 4.08 <sup>a</sup>	78.44 $\pm$ 5.85 <sup>a</sup>	74.22 $\pm$ 4.92 <sup>b</sup>
5.0	95.11 $\pm$ 3.02 <sup>a</sup>	85.44 $\pm$ 3.76 <sup>a</sup>	81.67 $\pm$ 4.18 <sup>a</sup>	81.44 $\pm$ 2.88 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup>Literal diferente en una columna indica diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )

## Conclusiones

Los presentes resultados permiten concluir que el uso de GSH a una concentración de 5mM durante la conservación de semen de ovino a 5°C tiene un

efecto positivo sobre la motilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos hasta por 24 h de almacenamiento y después de la reactivación a 37°C.

## Literatura Citada

- Aitken, R. J., H. M. Fisher, N. Fulton, E. Gomez, W. Knox, B. Lewis and S. Irvine. 1997. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitor *diphenylene iodonium* and quinacrine. *J. Mol. Reprod. Dev.* 47: 468-482.
- Anel-López, L., M. Álvarez-Rodríguez, O. García-Álvarez, M. Álvarez, A. Maroto-Morales, L. Anel, P. de Paz, J. J. Garde, and F. Martínez-Pastor. 2012. Reduced glutathione and Trolox (vitamin E) as extender supplements in cryopreservation of red deer epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 135:37-46.
- Appell, R. A., P. R. Evans and J. P. Blandy. 1977. The effect of temperature on the motility and viability of semen. *Br. J. Urol.* 49:751-756.
- Bucak, M. N., and N. Tekin. 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Rum. Res.* 73: 103-108.
- El-Sisy, G. A., W. S. El-Nattat, and R. I. El-Sheshtawy. 2007. Buffalo semen quality, antioxidants and peroxidation during chilling and cryopreservation. *Online J. Vet. Res.* 11: 55-61.
- Fraczek, M. and M. Kurpisz. 2005. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postepy. Hig. Med. Dosw.* 59:523-534.
- Gadea, J., M. Molla, E. Selles, M. A. Marco, F. A. Garcia-Vazquez, and J. C. Gardon. 2011. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology* 62:40-46.
- Gadea, J., E. Selles, M. A. Marco, P. Coy, C. Matás, R. Romar, and S. Ruiz. 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 62:690-701.
- Hicks, J. J., R. Y. Torres, y V. M. Sierra. 2006. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Rev. Endocrinol. Nutr.* 14:223-226.

- Kao, S. H., H. T. Chao and Y. H. Wei. 1998. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, 4: 657-666.
- Membrillo, O. A., I. A. Córdova, G. J. J. Hicks, C. I. M. Olivares, T. V. M. Martínez y M. J. J. Valencia. 2003. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *Interciencia*. 28(12):699-704.
- Munsi, M. N., M. M. U. Bhuiyan, S. Majumder, and M. G. S. Alam. 2007. Effects of exogenous glutathione on the quality of chilled bull semen. *Reprod. Domest. Anim.* 42:358-362.
- Naim, P., M. Cueto y A. Gibbons. 2009. Inseminación artificial a tiempo fijo con semen ovino refrigerado. *Arch. Zoot.* 58: 435-440.
- Vetter, C. M., J. E. Miller, L. M. Crawford, M. J. Armstrong, J. H. Clair, M. W. Conner, D. L. Wise, and T. R. Skopek. 1998. Comparison of motility and membrane integrity to assess rat sperm viability. *Reprod. Toxicol.* 12:105-114.
- Vivanco, M. H. W. 1998. Inseminación artificial en ovinos. *Memorias del Seminario Internacional: Aplicaciones de Técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y Caprinos*. Universidad Autónoma Chapingo, México. 135-194.
- Watson, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev.* 7:871-891.